

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ подписать \_\_\_\_\_ инициалы, фамилия

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

060301.07

Распределение генотипов гена фиколина (FCN2) в популяциях  
Красноярского края

|                                   |       |                          |
|-----------------------------------|-------|--------------------------|
| Научный руководитель              | _____ | д.б.н. Кратасюк В. А.    |
| Научный консультант               | _____ | к.б.н. Смольникова М. В. |
| Студент <u>ББ14-01Б,041402525</u> | _____ | Дынина Я. М.             |

Красноярск 2018

## Реферат

Выпускная квалификационная работа по теме «Распределение генотипов гена фиколина (FCN2) в популяциях Красноярского края» содержит 42 страницы текстового документа, 58 использованных источников.

ЛЕКТИН-ОПОСРЕДОВАННАЯ АКТИВАЦИЯ КОМПЛЕМЕНТА, ФИКОЛИНЫ, КОЛЛЕКТИНЫ, МЛАДЕНЧЕСКАЯ СМЕРТНОСТЬ, ПОПУЛЯЦИИ АРКТИЧЕСКИХ РЕГИОНОВ РОССИИ, ДЕФЕКТЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Цель работы: оценка распределения генотипов гена фиколина FCN2 (в точках rs 7851696 и rs 17549193), в популяциях Красноярского края.

Выделялась ДНК из сухих пятен крови от младенцев из разных популяций Красноярского края (долган – нганасане, ненцы, европейцы). Проводилось генотипирование аллельных вариантов гена FCN2 (в точках rs7851696 и rs17549193) используя методы: полимеразной цепной реакции, рестрикционного анализа продуктов амплификации и электрофоретической детекции в агарозном геле. Подготовлена сравнительная характеристика и перечислены особенности распределения частоты генотипов гена FCN2 в популяциях Красноярского края.

В результате исследования, выдвинуто предположение, что популяции арктических регионов характеризуются специфичностью генетического состава, ответственного за активность L-фиколина. Так же можно сказать, что данные популяции характеризуются генетической предрасположенностью к более высокому уровню функциональной активности L-фиколина по сравнению с европеоидной популяцией.

## Содержание

|   |    |
|---|----|
| Реферат .....   | 2  |
| Введение.....   | 3  |
| 1. 1 Тенденции формирования здоровья популяций, проживающих в условиях крайнего севера Красноярского края ..... | 5  |
| 1. 2 Популяционный состав Красноярского края .....  | 10 |
| 1. 2. 1 Коренные народы. Тунгусо-маньчжуры .....  | 11 |
| 1. 2. 2 Коренные народы. Тюрки .....  | 12 |
| 1. 2. 3 Коренные народы. Самодийцы .....  | 13 |
| 1. 3 Лектины .....  | 15 |
| 1. 3. 1 Маннозосвязывающий лектин.....  | 17 |
| 1. 3. 2 Влияние MBL на течение заболеваний новорожденных.....   | 19 |
| 1. 3. 3 Фиколины и их влияние на течение инфекционных заболеваний ....  | 20 |
| 2 Материалы и методы .....  | 23 |
| 2. 1 Группы .....   | 23 |
| 2. 2 Выделение ДНК по протоколу DNAprep .....   | 24 |
| 2. 3 Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) .....  | 26 |
| 2. 4 Метод рестрикционного анализа. ....  | 27 |
| 2. 5 Метод электрофоретической детекции .....   | 27 |
| 2. 6 Статистический анализ .....  | 29 |
| 3 Результаты и обсуждение .....   | 31 |
| 3. 1 Распределение частот генотипов гена фиколинау новорожденных различных популяций Красноярского края .....   | 31 |
| Заключение .....  | 34 |
| Список используемых источников.....   | 35 |

## Введение

Младенческая смертность является важной характеристикой общего состояния здоровья и уровня жизни населения страны. Показано, что генетически обусловленные особенности метаболизма и иммунных реакций у детей коренных народов Севера могут способствовать тяжелому течению распространенных инфекционных заболеваний с повышенным риском смертности в младенческом возрасте [1].

Наиболее актуальными заболеваниями для раннего возраста с высоким риском неблагоприятных исходов являются инфекции респираторного тракта и центральной нервной системы, вызванные группой инкапсулированных бактерий (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*) [2].

Лектин-опосредованная активация комплемента является одним из важных путей первой линии неспецифической защиты от инфекций. В настоящее время известно несколько молекул, активирующих лектиновый путь активации комплемента: фиколины и коллектины (маннозосвязывающий лектин (mannose binding lectin, MBL), печеночный коллектин-1 (collectin liver-1) и почечный коллектин-1 (collectin kidney-1)). Фиколины структурно и функционально гомологичны MBL, обладают способностью фиксироваться к углеводным компонентам бактерий с последующей активацией комплемента. Высокие показатели младенческой смертности в коренных популяциях арктических территорий России предположительно могут быть связаны с дефектами иммунной системы, вызванными вариантами гена L-фиколина (FCN2) [1].

До настоящего времени не проведен анализ полиморфизма генов, ассоциированных с нарушением отдельных путей иммунного реагирования, не исследованы распределения частот генотипов, предрасполагающих к тяжелому течению инфекций у детей раннего возраста в Арктических регионах России [2].

Целью настоящей работы является оценка распределения генотипов гена фиколина FCN2 (в точках rs7851696 и rs17549193), в популяциях Красноярского края.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить ДНК из сухих пятен крови от младенцев из разных популяций Красноярского края (долган – нганасане, ненцы, европейцы) с помощью метода с использованием сорбента по протоколу DIAtom™ DNA Prep.

2. Провести генотипирование аллельных вариантов гена FCN2 (в точках rs7851696 и rs17549193) используя методы: полимеразной цепной реакции, рестрикционного анализа продуктов амплификации и электрофоретической детекции в агарозном геле.

3. Провести сравнительную характеристику и выявить особенности распределения частоты генотипов гена FCN2 в популяциях Красноярского края (долган – нганасане, ненцы, европейцы).

Работа выполнена в Красноярском Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФГБНУ ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН) Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера (НИИ МПС)

## **1. 1 Тенденции формирования здоровья популяций, проживающих в условиях крайнего севера Красноярского края**

Сохранение и укрепление здоровья детского населения на Севере России в настоящее время имеет большую значимость. Это связано с резко снижающимся демографическим уровнем, медицинскими, биологическими и социально - гигиеническими факторами [3]. На данный момент территории на Севере России выделяют в особую зону, которая требует особого внимания, так как имеет тенденцию к резкому увеличению количества хронических болезней у детей и подростков Крайнего Севера, которая обуславливает актуальность прогнозирования и качественное проведение профилактических мероприятий на популяционном уровне.

Изучение детей Крайнего Севера, их здоровья открыло новые темы, для изучения распространенных, для тех территорий, детских заболеваний, это дает веский повод что бы подробно изучать проблемы краевой патологии, адаптации, этнических особенностях формирования и клинического течения заболеваний [4, 5, 6].

По данным многих авторов, проблема ухудшения здоровья детей и подростков северных регионов края, является одной из самых актуальных и весьма сложной [3, 4]. Северные регионы из –за своего климата, традиций коренного населения, труднодоступности, требуют пристального внимания и комплексного исследования во всех областях жизни и деятельности. Условия Севера создают для молодого растущего организма ряд сложностей, например, суровый климат и экология оказывают существенное влияние на процессы роста, способствуют развитию дезадаптивных реакций, так же снижению резервных гомеостатических механизмов и, следовательно, ведут к росту заболеваемости. Длительное воздействие таких факторов как укороченный световой день и продолжительный период «биологической темноты», повышенная активность космических излучений и магнитных полей, близкое расположение от поверхности почвы слоя вечной мерзлоты, специфический

аэродинамический режим ухудшают здоровья детей, и задерживают темпы морфофункционального развития [4, 6 - 11].

Вышеперечисленные тенденции развиваются на фоне высоких школьных нагрузок, ухудшающихся условий обучения и воспитания, а так же структуры и организации питания детей и подростков, снижения физической подготовленности и уменьшения занятий физкультурой и спортом, так же снижением проводимых профилактических мероприятий [3, 4, 7, 10, 12, 13].

В связи с этим, можно предположить, что пребывание на Крайнем Севере способствует появлению у детей ряда достаточно устойчивых факторов риска возникновения хронических неинфекционных заболеваний. Длительное пребывание в помещениях из – за долгой и суровой зимы создает условия для гипоксии и гиподинамии. Малоактивный образ жизни и несбалансированное питание способствует нарушениям в липидном обмене и повышению массы тела за счет отложения жира в подкожной клетчатке. Малое количество в рационе питания кальция и фтора подтверждается высоким уровнем заболеваемости детского населения кариесом. Так же изменяются биологические ритмы организма из-за аномальной фотопериодичности. А йоддефицитное состояние ведет к нарушению физиологических процессов адаптации и развитию целого комплекса патологических явлений, поэтому дети Крайнего Севера и ближайших к нему районов в большинстве случаев, нуждаются в диспансерном наблюдении и демонстрируют более высокий уровень распространенности различных заболеваний [3, 4, 6, 7, 10, 12, 13].

Анализ эпидемиологии заболеваемости, характеризующей здоровья детей Севера, позволил выявить, что за последние 5 лет наиболее значительный рост заболеваемости у детей до 14 лет пришелся на болезни органов пищеварения, мочеполовой, эндокринной и сердечно-сосудистой систем, значительно увеличился удельный вес травм и отравлений. Самыми распространенными заболеваниями в возрасте 15–17 лет являются болезни органов дыхания, болезни глаза и его придаточного аппарата, так же болезни органов

пищеварения, травмы и отравления, болезни кожи и подкожной клетчатки, костно-мышечная патология [3, 5 – 7, 11, 12, 14, 15].

Питанию в формировании здоровья детей на Севере в условиях фото и витаминной недостаточности традиционно принадлежит особая роль. По результатам некоторых авторов можно утверждать, что среди детей северных территорий широко распространены синдромы и симптомы алиментарных дефицитов, а именно белковые, витаминные, микроэлементные, а так же болезни нарушения питания и обмена веществ [6, 16]. Еще одна из самых актуальных проблем, это проблема гиповитаминозов, которая была подтверждена биохимическими исследованиями детей дошкольного и школьного возраста [16]. По абсолютному большинству витаминов был констатирован выраженный или глубокий дефицит. Эта ситуация сильно отразилась на формировании и клинических особенностях широко распространенных на Севере заболеваний детей и подростков. Известно, что дефицит витаминов С и А играет роль в снижении иммунитета, а фолиевой кислоты — в закладке нервной трубки, а следовательно в дезорганизации внутриутробного развития. Витамины Е, С и А в своей совокупности определяют антиоксидантную защиту.

Типичными для детей Севера являются этнические особенности формирования и клинического течения заболеваний. Примером могут служить результаты наблюдения за детьми с факторами риска к атеросклероза [6]. При равных условиях проживания в одной школе-интернате у детей были существенно выражены дисфункции сердечно-сосудистой и вегетативной нервной систем. Большое количество педиатрических работ, выполненных на Севере, было посвящено изучению гастроэнтерологической патологии. И здесь можно сделать вывод, что передаваемые по наследству признаки играют существенную роль, что видно на примере распространенности гиполактазии у детей различных этнических групп [6, 17]. Феномен влияния исторических процессов народонаселения оказался закономерным: среди детей пришлого населения (условно «европеоидов») она встречалась значительно реже, чем у



детей других этнических групп (коренное население). По данным многих авторов [4, 6, 16, 18], гиполактазия имеет большое значение в формировании заболеваний детей. Так как в течение многих лет считалось целесообразным строить рацион питания по традиционному европейскому образцу, а именно обязательными в рационе являлись молочные продукты и говядина. Это регламентировалось соответствующими инструкциями и постановлениями. А в действительности дети народностей Севера либо игнорировали молочные продукты, либо реагировали на них диареей, ухудшением самочувствия, болями в животе. Дети, которые провели лето в тундре и находились на близком к традициям северных народностей рационе, имели лучшие показатели здоровья.

Нельзя пройти мимо таких повреждающих факторов, как психические нагрузки. Проблема влияния психических нагрузок на здоровье детей северных регионов рассматривалась в Институте медицинских проблем Севера, она была поддержана рядом научных и учебных заведений Москвы, Красноярска, Иркутска, Иванова. Обследования проводились параллельно с педиатрами в различных поселках в Эвенкии, на Таймыре, Чукотке, районах БАМ, в НАО. Весь собранный материал помог выявить неоднозначность биологического и психического развития детей коренного и пришлого населения одного возраста.

Процесс адаптации детей пришлого населения к экстремальным условиям Крайнего Севера регулируется центральной нервной системой. У переехавших на Север детей наступает значительное психоэмоциональное напряжение, это проявляется в нарушении сна, аппетита, повышенной тревожности, появлении головной боли, болей в сердце, ухудшении самочувствия, а высокие нагрузки в школе и длительное пребывание в помещениях усугубляют ситуацию. У детей коренного населения также имеются проблемы адаптации, они явно выражены в период перехода от вольного ритма жизни к нормированному ритму при систематическом обучении, это возраст 6-7 лет, что явно вызывает стрессовую ситуацию и дополняет умственные нагрузки эмоциональными. Дети младшего школьного возраста более предрасположены к неврозам, дисфункции

желудочно-кишечного тракта, дискинезии желчевыводящих путей, вегетососудистой дистонии [6, 19].

Таким образом, дети и коренного, и пришлого населения имеют психоэмоциональные нагрузки различного типа, а отсутствие эволюционно выработанных механизмов предотвращающих это приводит к резкому ухудшению здоровья у детей коренных народностей Севера.

В настоящее время существует ряд работ, посвященных изучению перинатальных факторов риска: мертворождения и замершие беременности, преждевременные роды, медицинские аборт, самопроизвольное прерывание беременности, высокая инфекционная заболеваемость, курение и алкоголизация матерей, аллергизация, большое количество воспалительных заболеваний половых органов у женщин фертильного возраста. Перинатальные факторы риска и тяжелые факторы окружающей среды (неблагоприятная температура, магнитная активность, влажность, полярная ночь и другое) приводят к значительным ухудшениям здоровья новорожденных детей, повышая их заболеваемость [20 - 25].

К факторам младенческой смертности можно отнести следующее: медико-биологические факторы, например здоровье и возраст матери, масса новорожденного; социально-гигиенические факторы, например число детей в семье, условия жизни, уровень образования матери; медико-организационные факторы, например некачественное медицинское наблюдение за матерью и детьми. Одним из самых главных факторов смертности младенцев является недоношенность [13, 22, 26].

Во многих странах мира, а так же в России, проводится неонатальный скрининг – обследование всех новорожденных детей на такие наследственные заболевания как фенилкетонурия, врожденный гипотиреоз, адреногенитальный синдром, муковисцидоз, галактоземия [25].

Можно предположить что одной из важных причин заболеваемости и младенческой смертности жителей северных регионов являются

метаболические нарушения лектинового тутти (в том числе фиколина), которые могут быть генетически детерминированы.

## **1. 2 Популяционный состав Красноярского края**

К регионам Севера России полностью отнесены тринадцать субъектов, в том числе четыре – к регионам Арктики (Мурманская область и Ненецкий, Ямало-Ненецкий и Чукотский автономные округа). К районам Крайнего севера в красноярском крае относят Таймырский (Долгано-Ненецкий) и Эвенкийский автономные округа; города – Игарка и Норильск с территориями, находящимися в административном подчинении их городских Советов народных депутатов; районы – Северо-Енисейский и Туруханский [27].

Общая численность постоянного населения районов Крайнего Севера в Красноярском крае по данным 2010–2013 гг. составляет 51027 человек [28].

На территории края проживают представители 159 национальностей. К коренным народам Севера относят: долган, эвенков, ненцев, якутов, кетов, нганасанов, энцев, чулымцев [29].

### **1. 2. 1 Коренные народы. Тунгусо-маньчжуры**

К тунгусо-маньчжурской группе алтайской языковой семьи принадлежат эвенки, нанайцы, эвены и другие малочисленные народы.

Эвенки проживают в таёжной зоне Красноярского края. Эвенки — традиционные оленеводы и охотники. Ареал их расселения очень широк: от Охотского моря на востоке до Енисея на западе, от Северного Ледовитого океана на севере до Прибайкалья и Амура на юге. В нашем крае представители данного этноса проживают в основном в Эвенкии, а также в Енисейском, Туруханском, Северо-Енисейском районах и на Таймыре. На территории Красноярского края в 2010 году насчитывалось 4 372 эвенка, в целом по стране

— 37 843 человека. Самоназвание народа — «эвэнк», «тонгус», «орочен», «илэ». До революции их называли тунгусами.

В этногенезе (со второй половины I тысячелетия н.э.) эвенкийского народа главную роль сыграли два этнических компонента: местный восточносибирский и пришлый из Забайкалья и Приамурья тунгусоязычный. На территорию нашего края эвенки стали проникать с X-XI веков из Прибайкалья, спускаясь по Нижней Тунгуске и Ангаре. Уже в XVIII веке с Ангары под нажимом русских эвенки откочевали на север, в район Подкаменной Тунгуски. Другие группы продвинулись на запад и достигли Енисея, оттуда на север и далее по енисейским притокам Сыму и Турухану, вплоть до Хантайского озера на Таймыре, где часть родов вошла в состав формировавшегося на тот момент долганского этноса [29].

Помимо перечисленных народов, в Красноярском крае проживают и представители других северных и сибирских этносов, появившихся здесь сравнительно недавно.

Как и эвенки, к тунгусо-маньчжурской группе относятся нанайцы, эвены, удэгейцы, ульчи и негидальцы. Все они — коренные жители Дальнего Востока. С северо-востока страны на территорию края попали и представители чукотско-камчатской языковой группы: коряки, чукчи, ительмены (камчадалы) [29] .

### **1. 2. 2 Коренные народы. Тюрки**

Некоторые народности Красноярского края, такие как якуты, долганы, хакасы и чулымцы, принадлежат к тюркской группе алтайской языковой семьи.

В ходе миграции вниз по Лене из Прибайкалья тюрко-монгольских племен скотоводов и ассимиляции ими коренного населения, говорившего на

юкагирских и тунгусских языках, происходил этногенез якутов (этноним народа — саха) — основного и коренного населения Якутии, традиционных скотоводов.

На территории Красноярского края якутское население сосредоточено в основном на северо-востоке Эвенкии, в районе озера Ессей [29].

Переселившиеся в XIX веке из Якутии северные якуты-оленоводы стали одним из трёх компонентов уже другого тюркоязычного этноса — долган. Два других компонента — русские и тунгусы. Окончательное оформление долганского этноса происходит в начале XX века. Сейчас большая их часть проживает на востоке Таймырского Долгано-Ненецкого муниципального района, по рекам Хетта и Хатанга. Незначительные части этноса расселены по Авамской тундре на Енисее и в Анабарском улусе Якутии. Долганский язык до недавнего времени рассматривался как диалект якутского, сейчас считается самостоятельным.

Хакасы (основное население Республики Хакасия) и чулымцы, входящие в ту же языковую группу, проживают на юге нашего края [29].

До революции хакасов называли абаканскими и минусинскими татарами. Этот этнос является потомком древнего населения Минусинской котловины. Тюркский язык появился здесь примерно в III веке до н.э. Потом тюркская составляющая только усилилась. Одним из главных этнических компонентов хакасов как этноса были кыргызы, основатели известного Кыргызского каганата.

Зона расселения чулымцев — среднее и нижнее течение реки Чулым, притока Оби. Их предки, выходцы из Южной Сибири, начали переселяться в районы нынешнего обитания с XIV-XV веков, постепенно заимствуя элементы культуры кызыльцев, нарымских селькупов, томских татар, кетской и монгольской традиций [29].

К тюркской языковой группе также относятся: тувинцы, шорцы, алтайцы, тофалары, кумандинцы, телеуты. Все они являются выходцами из Южной Сибири. Также к алтайской языковой семье, но только к её монгольской группе, принадлежат буряты.

### **1. 2. 3 Коренные народы. Самодийцы**

Большинство представителей самодийской группы урало-юкагирской языковой семьи (нганасаны, энцы, ненцы) проживают на Таймыре, и лишь один самодийский народ — селькупы — расселён на территориях к юго-западу от Таймырского полуострова. Нганасаны, самый самобытный народ нашего края. Проживают они в северной и центральной части Таймыра. В наше время нганасаны делятся на две группы: западную (авамских нганасан), с центрами в посёлках Усть-Авам и Волочанка Дудинского муниципального образования, и восточную (вадеевских нганасан), с центром в посёлке Новая Хатангского муниципального образования [29].

На образование нганасан, как этноса большое влияние оказали тунгусы и самодийские народы, нападавшие на них в XVII—XVIII веках. Сейчас же можно сказать, что наряду с признаками палеоазиатских племен, в этносе нганасан присутствуют тунгусские (эвенкийские) черты [30].

Еще пару веков назад нганасаны заключали браки, только с людьми из своего этноса, иногда делая исключения с близким по культуре и языку народом — энцами. В настоящее время резко увеличилось число браков с другими национальностями, такими как долганы и русские [31].

Близким к нганасанам народом считаются энцы, проживающие в посёлках Воронцово и Потапово Усть-Енисейского района. Название «энцы» было предложено в 1930-х годах, принято же только в 1980-х. Сложение энецкого этноса произошло в результате слияния в низовьях Енисея двух групп населения: местного аборигенного (прауральского) и самодийского,

пришедшего с юга (Присаянье, Южная Сибирь, Среднее Притомье). В состав Русского государства предки энцев были включены в начале XVII века [29].

В XVII-XVIII веках в численности и расселении энцев происходят большие перемены. Продвижение соседей с запада (ненцы) и юга (селькупы, кеты и эвенки), а затем и три войны с ненцами, эпидемии оспы и голод существенно сократили численность энецкого народа и оттеснили его на правобережье Енисея и Енисейского залива — ниже Дудинки, в район села Потапово.

К самодийским народам относится и наиболее крупный из коренных малочисленных народов Севера — ненецкий [29]. Ненцы входят в три национальных административно-территориальных образования: Ненецкий автономный округ в Архангельской области, Ямало-Ненецкий автономный округ в Тюменской области и Таймырский Долгано-Ненецкий муниципальный район в Красноярском крае [30].

Ненцы считаются потомками древнего самодийского населения лесостепных областей Прииртышья и Притоболья. Со временем они мигрируют на север, в таежные и тундровые районы Заполярья и Приполярья, где хорошо уживаются с местным населением. Далее они продвигаются из низовьев Оби на запад до Белого моря и на восток до Енисея, где взаимодействуют с местными энцами, образуя енисейских ненцев [30].

В настоящее время большинство ненцев проживают на Таймыре, образуя около десятка моноэтнических поселков, другие кочуют в тундре в районе поселков Тухард и Носок, небольшая часть проживает в Дудинском муниципалитете.

Енисейские ненцы говорят на тундровом диалекте ненецкого языка, это связано с давними связями с энцами, в то же время русским языком владеют около 90% населения, а родным около 70% [31].

### 1. 3 Лектины

Система комплемента является древнейшим компонентом врожденного иммунитета, основной функцией которого является преимущественно интраваскулярная элиминация бактериальных агентов. Кроме того, протеины комплемента играют роль своеобразного моста между системами врожденного и адаптивного иммунитета, обеспечивая адекватные условия для созревания и дифференциации В- и Т-лимфоцитов. Система комплемента состоит из плазменных протеинов и мембранных рецепторов. Плазменные протеины взаимодействуют между собой тремя известными каскадными путями – лектиновым (наиболее филогенетически древним), альтернативным и классическим [32].

Лектины – общий термин протеинов, способных к распознаванию и агрегации молекул олиго- и полисахаридной природы. Среди всех лектинов уникальными функциями формирования комплексов с углеводными компонентами микробной стенки обладают фиколины и коллектины (маннозосвязывающий лектин (mannose-binding lectin, MBL), печеночный и почечный коллектины). Образование сложного комплекса полисахариды микробной стенки+фиколин/коллектин+специфические протеазы приводит, в итоге, к активации системы комплемента, такой путь активации называется лектиновым [32].

Классический путь активации комплемента происходит при взаимодействии антителсодержащих иммунных комплексов с субкомпонентом комплемента C1q, в свою очередь лектиновый и альтернативный пути активации, не требуют наличия специфических антител. Все три пути активации предназначены для важнейшей реакции, при которой центральный компонент системы комплемента отщепляет протеин C3, образуя новый фрагмент C3b, который изменяет чужеродные клетки, тем самым подготавливая их фагоцитозу. В это же время активируются “поздние” компоненты комплемента (C5-C9), которым не требуются фагоцитирующие



клетки, так как они сами имеют свою цитолитическую активность. Следовательно, можно сделать вывод что, лектиновый путь активации комплемента, не нуждается в выработке специальных антител, этот древнейший путь активации является первым для неспецифической противоинфекционной защиты. Еще одной важной функцией некоторых лектинов является процесс адсорбции антител и факторов комплемента, усиливающих фагоцитоз на поверхности микроорганизмов и других инородных частиц.

Генетически заложенный дефицит компонентов системы комплемента является предрасположенностью к самым различным бактериальным инфекциям. Врожденный дефицит компонентов классического пути активации комплемента, таких как C1Q, C1R, C1S, C4, особенно гомозиготный дефицит C2, говорит о предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям и инфекциям, вызываемыми инкапсулированными бактериями – *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* [59]. Дефицит C5-C9 терминальных компонентов классического пути активации говорит о предрасположенности к инфекциям, вызванным бактериями *Neisseria meningitidis*. При исследовании группы детей из Дании (15 человек) с пневмококковыми заболеваниями в период рецидивов инвазивной формы без классических факторов риска у 6 (40 %) имелись лабораторные признаки дефицита C2-компонента комплемента [33].

### **1. 3. 1 Маннозосвязывающий лектин**

Маннозосвязывающий лектин (Mannose-bindinglectin, MBL) – острофазовый белок, относящийся к системе врожденного иммунитета и активно участвующий в выведении широкого круга патогенных микроорганизмов из организма путем активации системы комплемента или процессом адсорбции антител и факторов комплемента, усиливающих фагоцитоз на поверхности микроорганизмов и других инородных частиц. Функцию опсоинов могут выполнять антитела или компоненты.

Белок MBL синтезируется макрофагами печени и относится к коллектинам. Для них характерно присутствие коллагеноподобного и лектинового доменов. Лектиновый домен обеспечивает взаимодействие со специфическими углеводными группами на поверхности бактериальных клеток и вирусных частиц. MBL - это гликопротеин, состоящий из 228 аминокислот, в котором можно выделить такие домены как N-концевой, коллагеноподобный гликозилированный, образующий длинный соединительный участок, короткий шеечный, представленный  $\alpha$ -спиралью и C-терминальный домен, взаимодействующий с углеводом на мембране микроорганизма. Белок MBL состоит из трех пептидных цепей, образующих субъединицу, в виде четвертичной структуры, состоящей из 2–6 базовых субъединиц [34].

Большая часть людей имеет врожденно низкий уровень маннозосвязывающего лектина (MBL). Из – за наличия в организме различных вариантов гена MBL2, люди имеют предрасположенность к более тяжелому течению самых разнообразных инфекционных заболеваний.

Ген MBL2, расположенный в хромосомном участке 10q11.2, кодирует продукцию маннозосвязывающего лектина. Изменения как в промоторе, так и в кодирующем регионе гена MBL2 влияет на экспрессию и функциональную активность данного протеина. В связи с этим наиболее исследованы три полиморфных кодона 1 экзона гена MBL2: 52 (rs5030737), 54 (rs1800450) и 57 (rs1800451), вариантные аллели которых обозначаются как D, В и С, соответственно, а дикий аллель – А [35]. Наличие любого из этих вариантов аллелей, говорит о наличии нестабильного и функционально дефектного гена MBL, следовательно малая концентрация нужного варианта гена, а следствие и низкая способность активировать комплимент [36].

Результаты изучения защитной роли MBL при возбудителях *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, довольно противоречивы, считают, что отсутствие связывания MBL с бактерией и резкое снижение комплемент-активирующего эффекта имеет место быть при наличии капсулы *Streptococcus pneumoniae* [37].

Так же имеются данные, что у пациентов с пневмококковым сепсисом, при плазменном уровне  $MBL < 0.5$  мкг/мл, увеличивался риск летального исхода. Такая зависимость сохранялась после поправки на пневмококковую бактериемию и коморбидные заболевания. Ученые из Великобритании говорят, что при наличии MBL-дефицита, происходит значительное увеличение риска инвазивной пневмококковой инфекции [38]. В то же время ученые из Бельгии и Дании опровергли теорию ученых из Великобритании [39]. Их исследования не показали наличие связи полиморфизмов гена MBL2 с инвазивными пневмококковыми инфекциями, а наоборот полиморфизм гена MBL2 rs7095891 связан с обычным риском развития пневмонии [40, 41].

Из – за противоречивых предположениях о роли врожденного MBL-дефицита при пневмококковых инфекциях сложно говорить именно о его дефиците, как таковом, следовательно, стоит заострить внимание на генетически детерминированную недостаточную активность функционально необходимых для MBL специфических протеаз [42].

### **1. 3. 2 Влияние MBL на течение заболеваний новорожденных**

Маннозосвязывающий лектин (MBL) — один из ключевых факторов гуморального врожденного иммунитета, который запускает один из путей активации комплемента. Следовательно, MBL в разных клинических ситуациях либо улучшает прогноз протекания заболеваний у больных, либо, наоборот, является фактором риска осложнений [43].

Маннозосвязывающий лектин (MBL) взаимодействует с N-ацетилглюкозамином и маннозой, которые содержатся в составе липополисахаридов клеточной стенки бактериальных клеток, грибов и в составе гликопротеинов на поверхности вирусных частиц, но в то же время практически отсутствующих на мембранах клеток млекопитающих, и

активирует классический путь комплемента без участия антител и C1 фактора, вызывает фагоцитоз микроорганизмов [34].

Многие исследования MBL белка связаны с изучением бронхиальной астмы (БА), а именно их связи, как в виде плазменного количества, так и наличием различных полиморфных вариантов. Было установлено наличие связи рецидивирующих обструктивных эпизодов у детей с генетическим вариантом СТ гена MBL2 в точке rs1800450 [44].

Так же имеется связь MBL2-non-A/A генотипов с рецидивирующими инфекциями и тяжёлым течением бронхиолита в грудном возрасте, которая ассоциирована с рецидивами бронхообструкции [45].

Подобные данные подтвердились и у детей возраста 5 – 7 лет, они говорили о повышенном риске бронхиальной астмы после перенесенного ранее бронхиолита [46].

Если говорить именно о MBL дефиците, то стоит сказать о таком заболевании легких как, здесь тяжесть поражения легких тесно связана. Усугубить врожденный дефицит MBL при муковисцидозе (МВ) может способность нейтрофильных энзимов разрушать MBL непосредственно в просвете бронхов и тканях респираторного тракта.

Можно заметить, что у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), которые имеют вариант В гена MBL2, наблюдается большее количество обострений, связанных именно с бактериальной инфекцией [47].

При высоком уровне MBL у пациентов хорошо развивался реципиентов облитерирующий бронхиолитический синдром (ОБС) с плохим долгосрочным прогнозом. Иммуногистохимический анализ показал наличие MBL в легочной ткани от пациентов с ОБС в момент ишемии. Так же, ученые выявили значительное увеличение концентрации MBL через 3, 6 и 12 месяцев после трансплантации. Наличие MBL в бронхоальвеолярном лаваже было связано с развитием позднего ОБС. Другие ученые не обнаружили разницы между уровнем MBL и временем после трансплантации легких. При проведении

исследований третья группа ученых не нашли связи между концентрацией MBL и развитием ОБС, но выявили значительное снижение уровня MBL после трансплантации. Сделан вывод, что низкая концентрация MBL связана с лучшим прогнозом [48, 49].

### **1. 3. 3 Фиколины и их влияние на течение инфекционных заболеваний**

Фиколины – это молекулы, распознающие лектин и по структуре и функциям идентичны молекулам MBL. Известно три группы фиколинов. Первая группа - М-фиколины (FCN1), которые образуются в легких, моноцитах и селезенке и являются исключительно тканевой молекулой. Вторая группа - L-фиколины (FCN2), они образуются в печени и циркулируют в крови. И третья группа - это Н-фиколины (FCN3), они образуются в печени и легких. Так же можно заметить, что Н-фиколин в большей степени образуется в легких, и его комплемент-связывающая способность больше способности MBL.

Структуры фиколинов и MBL очень похожи друг на друга, они имеют идентичные домены для связи с углеводными компонентами бактерий. Но стоит отметить, что L-фиколин, может связывать некоторые компоненты инкапсулированных грамположительных бактерий, даже в капсульной форме, чего не может делать MBL. Это такие виды бактерий как *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* [32].

Были описаны полиморфизмы в структурах и промоторах генов FCN2 и FCN3, которые показывали их различия в концентрации, но не было зафиксировано полного отсутствия фиколинов в плазме крови. Так же не изучена роль фиколинов в предрасположенности к пневмококковой инфекции у человека, но испытания на мышах показывают важную их необходимость для противопневмококковой иммунной защиты [32].

Как было уже сказано выше, лектин-опосредованная активация комплемента является одной из главных для неспецифической защиты от инфекций. Молекулами, активирующими лектиновый путь активации

комплемента, являются фиколины и коллектины. Фиколины, так же, как и молекулы MBL, фиксируются к углеводным компонентам бактерий, и в последствии активируют комплемент клетки. В настоящее время известны полиморфизмы в промоторе и экзонах гена, которые вызывают большие различия в его концентрациях в плазме [50].

Известно, что редко встречающийся аллель Т влияет на снижение связывающей способности L-фиколина с углеводными компонентами бактериальных клеточных стенок, хотя этот аллель Т связан с высокой связывающей способностью [51].

Имеются исследования, которые показывают, что высокий уровень L-фиколина связан, именно с этим вариантным минорным аллелем [52, 53]. Из выше сказанного можно предположить, что высокая концентрация L-фиколина в плазме, говорит о его низкой способностью связывать патоген, и из-за этого не происходит его накопления в очаге воспаления.

Предполагается, что популяции арктических районов Сибири, имеют специфический генетический состав, ответственный за активность L-фиколина. А именно предполагается, что эти популяции генетически более предрасположены к высокому уровню функциональной активности L-фиколина, что нельзя сказать про европеоидов.

Можно сказать, что популяция ненцев, по сравнению с остальными популяциями Восточной Сибири, обладает очень высоким уровнем неспецифической противомикробной защиты [15].

Из литературных данных, описанных выше, отчетливо видно, что влияние FCN2 на здоровье весьма велико. Так же мы видим, что к настоящему времени, не имеется исследований, посвященных изучению распространенности генетического дефекта и функциональной активности фиколина у детей коренных популяций арктических регионов Красноярского края, даже несмотря высокий уровень младенческой смертности в этих популяциях, а так же большую вероятность выявления иммунодефицитных состояний указанных выше. Проведение данного исследования позволит

определить полиморфизм и частоту врожденного дефицита гена фиколина (FCN2).

## **2 Материалы и методы**

### **2. 1 Группы**

Новорожденные Красноярского края (n=216) разделены на группы для изучения частоты распределения аллельных вариантов полиморфизмов FCN2:

1) новорожденные из деревень с преобладающим ненецким населением (ненцы составляют 85% населения, n=126);

2) новорожденные с преобладающим долгано-нганасанским населением (долганы-нганасаны составляют 91% населения, n=90);

В качестве контрольной группы были набраны 203 новорожденных из города Красноярска, европеоидного происхождения по анкетным данным матерей.

### **2. 2 Выделение ДНК по протоколу DNAprep**

Выделение ДНК из проб сухой капли крови было осуществлено с помощью тест систем DIAtom™ DNA Prep (ООО «Центр молекулярной генетики», Москва). Набор реагентов DIAtom™ DNA Prep основан на использовании Лизирующего реагента с гуанидинтиоцианатом, который предназначен для лизиса клеток, солюбилизации клеточного дебриса, а также для денатурации клеточных нуклеаз.

Протокол выделения ДНК:

1. Приготовление рабочего раствора солевого буфера. Содержимое флакона с 10-кратным солевым буфером, 5 мл, перенести в мерный цилиндр, довести бидистиллированной водой до метки 50 мл и 96% этиловым спиртом до метки 150 мл и перемешать. Готовый рабочий раствор солевого буфера следует хранить в герметично закрытой посуде при температуре 4°C.



2. В пробирку объемом 1,5 мл внести 100 мкл исследуемой пробы, добавить 400 мкл лизирующего реагента и перемешать содержимое пробирки переворачиванием (5 – 10 раз).

3. Термостатировать пробирку со смесью 1 час (уменьшили до 40 мин.).

4. После термостатирования центрифугировать пробирку со смесью 10 с при 5000 g в том случае, если смесь содержит несолюбилизированный клеточный дебрис или другой нерастворимый осадок. Прозрачный супернатант целиком перенести в чистую пробирку.

5. В пробирку с чистой смесью добавить 20 мкл суспензии сорбента NucleoS<sup>TM</sup> (Перед использованием NucleoS<sup>TM</sup> следует интенсивно встряхнуть на вортексе).

6. Пробирку поместить на ротатор и перемешивать 20 мин (10-20 об/мин) (уменьшили до 10 мин.).

7. Центрифугировать 10 с при 5000 g.

8. Осторожно, не задевая осадка, удалить супернатант с помощью водоструйного насоса.

9. К осадку добавить 200 мкл лизирующего реагента, тщательно перемешать на вортексе до полного гомогенного состояния.

10. Добавить в пробирку 0,5 мл рабочего раствора солевого буфера.

11. Перемешать содержимое пробирки переворачиванием пробирки 5 – 10 раз.

12. Центрифугировать 10 с при 5000 g.

13. Осторожно удалить супернатант, не задевая осадка, с помощью водоструйного насоса.

14. Добавить в пробирку 0,5 мл Солевого буфера, перемешать содержимое пробирки на вортексе, центрифугировать 10 с при 5000 g и осторожно удалить супернатант с помощью насоса.

15. Повторить положение 14.

16. Посушить осадок при температуре 65°C в течение 4 – 5 мин.

17. В эту же пробирку внести 50 – 100 мкл ЭкстраГена™ (100 мкл, если выделение ДНК проводится из 200 мл цельной крови или другой богатой ДНК пробы).

18. Суспендировать содержимое пробирки на вортексе 5 – 10 с до получения гомогенной суспензии, потом термостатировать 4 – 5 мин при 65°C.

19. Еще раз суспендировать содержимое пробирки на вортексе перед центрифугированием.

20. Центрифугировать 1 мин при 10000 g.

21. Перенести супернатант с ДНК в чистую пробирку. ДНК хранить при температуре – 20°C.

### **2. 3 Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

Для увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе) использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1. Для этого подготовили реакционную среду объемом по 24 мкл на 20 образцов, которая состояла из:

- Буфер – 50 мкл
- H<sub>2</sub>O – 347,4 мкл
- dNTP – 20 мкл

- Праймер FCN1 – 30 мкл
  - Праймер FCN2 - 30 мкл
  - Taq полимераза – 2,5 мкл
2. Реакционную смесь разнесли в 20 пробирок по 24 мкл.
  3. Покрыли минеральным маслом для предотвращения испарения.
  4. В каждую пробирку добавили по 1 мкл ДНК. Общий объем одной пробы составил 25 мкл для одной пробы: 24 мкл реакционной среды и 1 мкл ДНК.
  5. Поставили пробирки в амплификатор, выставили нужную программу и провели ПЦР. В процессе работы подбирали оптимальный режим установленный в программе ПЦР в интервалах:
    - Стадия денатурации - 95 °С – 3 мин;
    - Стадия отжига - 60 °С – 30 сек;
    - Стадия элонгации - 72 °С - 7 мин.

## **2. 4 Метод рестрикционного анализа.**

С помощью метода рестрикционного анализа продуктов амплификации произвели разрез цепочки ДНК, осуществляемый специальным ферментом (рестриктазой).

1. Препараты после ПЦР разлили, каждый в две микропробирки.
2. В одну добавили рестриктазу MroXI (для мутации в точке rs7851696), в другую - HpySE526 I (для мутации в точке rs17549193). Концентрация рестриктаз – 2 единицы на образец. Рестриктаза MroXI режет по аллелю «дикого» типа – G: 237 bp, по редкому аллелю– T: 110+127. Рестриктаза HpySE526 I режет по аллелю «дикого» типа – C: 48+189, по редкому аллелю – T: 237.

3. Рестрикцию продукта проводили в течение 14 часов при воздействии рестриктазы MroXI и в течении 14 - 16 часов при воздействии рестриктазы HpySE526 I, обе при температуре 37°C.

## **2. 5 Метод электрофоретической детекции**

Полученные фрагменты ДНК разделили по размеру (длине) методом электрофоретической детекции.

При проведении электрофореза фрагменты ДНК мигрируют в геле под воздействием сил электрического поля. Электрофорез проводили в камере, заполненной буферным раствором.

1. Приготовили 2% агарозный гель:

- 2,4 г агарозы
- 120 мл буфера 1×TBE

Буфер TBE (200 мл 10xTBE довести до 2 л дистиллированной водой + 80 мкл Ethidium bromide [1мг/мл])

3. Раствор довели до кипения, кипятили 60 – 90 секунд.

4. Остудили до температуры 50 – 60°C.

4. Залили в форезную камеру, на подложке закрепили гребенку так, чтобы между зубцами и подложкой было расстояние 1 – 2мм, дали агарозному гелю застыть в течение 40-45 мин.

5. Образцы разнесли по лункам, 10 мкл каждого образца в последовательно расположенные лунки.

6. Для контроля в одну из лунок занесли ДНК маркер.

7. Закрыли крышку электрофоретической камеры и подсоединили электропровода таким образом, чтобы ДНК перемещалась в сторону анода, подали напряжение, предварительно установили значение напряжения 120 – 130V, включили ток на 30 – 45 мин.

8. Продолжали электрофорез до того момента, когда образцы пройдут нужное расстояние в геле (~ 30 - 50 минут: в процессе работы подбирали оптимальное время для расхождения фрагментов ДНК).

9. Отключили ток, отсоединили провода и крышку электрофоретической камеры.

10. Поместили гель на фильтр УФ трансиллюминатора и сфотографировали гель. На фоне темно-синей подсветки УФ-светом в геле наблюдали полосы красного цвета. Эти полосы и есть флюоресценция этидия, который связался с ДНК.

Свечение образцов происходит благодаря бромистому этидию, который присутствует в буфере и в агарозном геле.

На рисунке 1 показаны возможные генотипы для исследованных мутаций в гене FCN2.

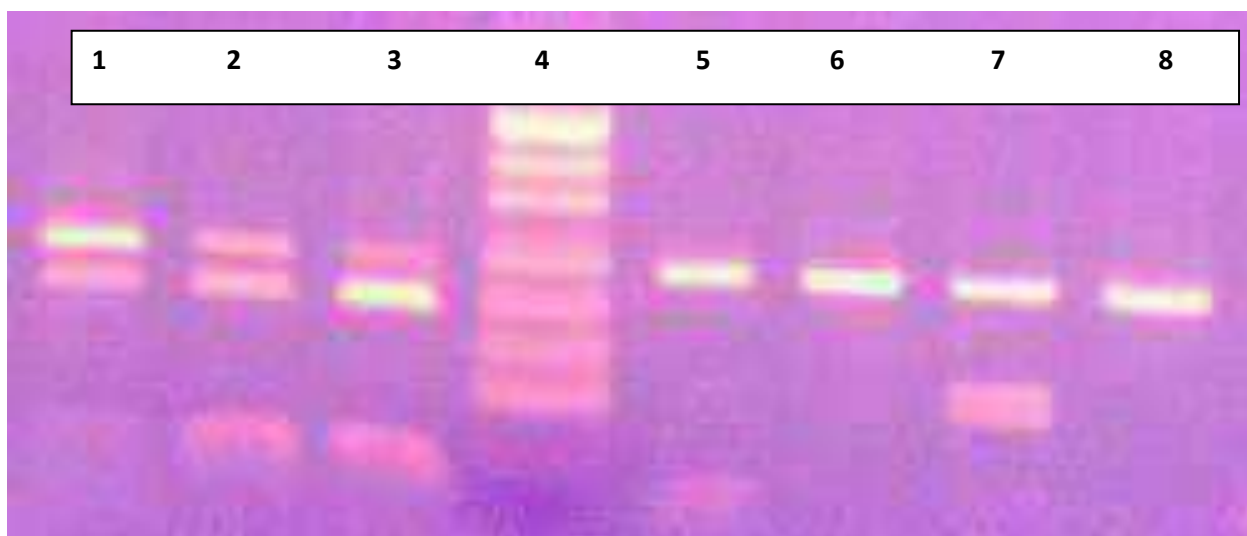


Рисунок 1. Возможные генотипы для исследованных мутаций в гене FCN2.

Обозначения: 1-3 результаты гидролиза полиморфизма rs 17549193 (рестриктаза HpySE526 I): 1, 2 – гетерозигота TC (237 п.о.+189 п.о.+48 п.о. (на рисунке не виден)), 3 – гомозигота CC (237 п.о.); 4 – маркер молекулярного веса pUC19/Msp I; 5-8 – результаты гидролиза полиморфизма rs7851696

(рестриктаза Mro X I): 5, 6, 8 – гомозигота GG (237 п.о.), 7 – гетерозигота (237 п.о.+127 п.о.+110 п.о.); п.о. – пар оснований.

## **2. 6 Статистический анализ**

Соответствие частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга было проверено с использованием либо  $\chi^2$ , с использованием онлайн-калькулятора GenExpert ([http://gen-exp.ru/calculator\\_or.php](http://gen-exp.ru/calculator_or.php)).

Были рассчитаны коэффициент отношения шансов (OR) и его 95% доверительный интервал (CI), для оценки силы ассоциации.

### 3 Результаты и обсуждение

#### 3. 1 Распределение частот генотипов гена фиколинау новорожденных различных популяций Красноярского края

При анализе распределения FCN2 генотипов нами установлено, что в случае мутации +6359C>Tв популяциях новорожденных ненцев и долган-нганасан значительно реже встречается вариантный аллель Т в гетерозиготном состоянии (генотип СТ), таблица 1.

Таблица 1. Распределение FCN2 генотипов у новорожденных различных национальностей Красноярского края и г. Красноярска, абс. (%)

| FCN2генотип              |     | Ненцы<br>(n=126) | Долганы -<br>нганасаны<br>(n=90) | Европеоиды<br>(Красноярск)<br>(n=203) | p*                     |
|--------------------------|-----|------------------|----------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
|                          |     | 1                | 2                                | 3                                     |                        |
| rs17549193<br>(+6359C>T) | CC  | 82 (65.1%)       | 51 (56.6%)                       | 72 (35.4%)                            | 1,2- 3=0.007           |
|                          | CT  | 42 (33.3%)       | 33 (36.7%)                       | 112 (55.2%)                           | 1-3=0.001<br>2-3=0.005 |
|                          | TT  | 2 (1.6%)         | 6 (6.7%)                         | 19 (9.4%)                             | 1-2=0.05<br>1-3=0.005  |
|                          | T** | 0.37             | 0.50                             | 0.74                                  | 1-2=0.048<br>1-3<0.001 |
| rs7851696<br>(+6424G>T)  | GG  | 108 (85.7%)      | 83 (92.2%)                       | 174 (85.7%)                           |                        |
|                          | GT  | 17 (13.5%)       | 7 (7.8%)                         | 27 (13.3%)                            |                        |
|                          | TT  | 1 (0.8%)         | 0 (0%)                           | 2 (1.0%)                              |                        |
|                          | T** | 0.15             | 0.08                             | 0.15                                  | 2-1=0.11               |

\* – представлены только данные с  $p \leq 0.1$

\*\* – в строке представлены частоты вариантного аллеля Т в изученных популяциях

При этом, в популяции ненцев значительно реже, чем в других этнических группах встречается “неблагоприятный” вариантный аллель Т в гомозиготном состоянии. Эта тенденция верна как при сравнении ненцев с долгано-нганасанами ( $OR=0.23$ ,  $CI=0.05-1.2$ ,  $p=0.05$ ), так и, в особенности, с европеоидами г. Красноярска ( $OR=0.16$ ,  $CI=0.04-0.07$ ,  $p=0.005$ ). Частота встречаемости вариантного аллеля Т в ненецкой популяции была статистически значимо ниже в сравнении с долгано-нганасанской и европеоидной популяциями. Мы предполагаем, что такой генотип, характерный для ненецкой популяции (но не для долгано-нганасанской популяции) является генетическим маркером высокой функциональной активностью L-фиколина в этой этнической группе.

Нами не выявлено статистически значимых различий в распределении частот генотипов мутации rs7851696 гена FCN2 среди изученных нами популяций, однако обращает на себя внимание факт почти 2-х кратное снижение частоты встречаемости “благоприятного” Т-аллеля в долгано-нганасанской популяции в сравнении с популяциями ненцев и европеоидов г. Красноярска. Не исключено, что такая низкая частота встречаемости “благоприятного” генотипа, характерная для долган-нганосан и ассоциированная с низкой функциональной активностью L-фиколина, может быть подтверждена дальнейшими исследованиями с большей статистической мощностью (большим числом наблюдений в выборке).

В настоящее время предполагается, что для мутации rs17549193 наличие вариантного аллеля Т (генотипы СТ и ТТ) связано с низкой связывающей способностью фиколина к патогенам. Группа ученых показали, что вариант гена FCN2 с мутацией +6359C>Т связан с высоким уровнем заболеваемости висцеральным лейшманиозом, так же они наблюдают большое содержание фиколина в плазме. Ученые предполагают, что высокое содержание L-



фиколина в плазме, происходит из-за его низкой способности связываться с бактерией, из-за чего он не накапливается и не задерживаться в очаге воспаления[54].

Другую ситуацию можно наблюдать с мутацией rs7851696, где, с большой вероятностью можно говорить о том, что с низкой связывающей способностью сопряжен нормальный (дикий) вариант гена FCN2 (генотип GG). Некоторые ученые, исследуя здоровых доноров из Дании показывают, что уровень L-фиколина в плазме, от гетеро- до гомозиготного состояния, резко снижался при наличии мутации +6424G>T (генотипы GT и TT). Здесь ученые говорят, что наличие вариантного аллеля сопряжено с высокой тканевой активностью L-фиколина и его низкой концентрацией в плазме крови [55] .

Так же было показано, что генетические полиморфизмы, расположенные в 8 экзоне гена FCN2, приводят к аминокислотной замене аланина на серин (p.A258S, мутация +6424G>T), тем самым повышают способность фиколина прикрепляться к углеводным компонентам бактерий. А при замене тирозина на метионин (p.T236M, мутация +6359C>T), наоборот, снижают способность прикрепляться[56].

В связи с этим можно сделать следующие выводы точки зрения тканевой функциональности фиколина: при наличии мутации +6359C>T вариантные генотипы СТ и ТТ являются не выгодными; при наличии мутации +6424G>T, нормальным вариантом генотипа является генотип GG. И можно утверждать, что такие генотипы имеют высокие уровни L-фиколина в плазме крови. В то же время они имеют низкую связывающую способность, но хорошо и в больших количествах накапливаются в тканях[57, 58].

## **Заключение**

Таким образом, результаты, полученные в настоящем исследовании, позволяют предположить, что арктические популяции Восточной Сибири характеризуются специфичностью генетического состава, ответственного за активность L-фиколина. Можно предположить, что популяции Арктики характеризуются генетической предрасположенностью к более высокому уровню функциональной активности L-фиколина по сравнению с европеоидной популяцией. Показано, что население ненцев имеет несколько важных особенностей по сравнению с долганами-нганасанами: более низкая распространенность аллеля Т для полиморфизма rs17549193 и более высокая распространенность аллеля Т для полиморфизма rs7851696. Результаты текущего показывают, что население ненцев имеет самый высокий уровень неспецифической противoinфекционной защиты по сравнению с другими популяциями Восточной Сибири. Дополнительный анализ заболеваемости инфекционными болезнями в изученных популяциях позволит выявить фенотипические характеристики населения ненцев, связанные с повышенной функциональной способностью L-фиколина как одного из важных агентов инфекции первого ряда защитного агента.

## Список используемых источников

1. Смольникова, М. В. Полиморфизм гена L-фиколина (FCN2) в арктических популяциях России / М. В. Смольникова, В. Б. Епанешникова, С. Н. Зобова, С. Ю. Терещенко // НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, России
2. Смольникова, М. В. Этнически ассоциированные факторы риска высокого уровня младенческой смертности у детей коренного населения крайнего севера: исследование генетической предрасположенности (*mbi2*, *fcn2*) к инфекционным заболеваниям / М. В. Смольникова, В. Б. Епанешникова, С. Ю. Терещенко // Медицинская Иммунология. – Санкт – Петербург, 2017. - Т. 19, Специальный выпуск. – С. 82 –83
3. Макарова, В. И. Основные проблемы здоровья детей на Севере России / В. И. Макарова, Л. И. Меньшикова // Экология человека. – 2003. – № 1. – С. 39–41.
4. Зубов, Л. А. Медико-социальные проблемы детей коренного населения Ненецкого автономного округа / Л. А. Зубов, Г. Н. Дегтева, Е. Н. Сибилева. // Проблемы адаптации человека к экологическим и социальным условиям севера: Сыктывкар. – 2004. – С. 43–45.
5. Капустина, Т. А. Этнические особенности распространенности хронических заболеваний уха, горла и носа у детей северных регионов Восточной Сибири / Т. А. Капустина // Педиатрия. – 2001. – № 2. – С. 49–51.
6. Пряхин, Е. И. Медико-биологические аспекты здоровья детей на Севере / Е. И. Пряхин // Сибирское медицинское обозрение . – 2002 . – № 1 . – С. 3–7.
7. Артемова, Н. А. Состояние здоровья детей города Северодвинска – Государственного Российского Центра атомного судостроения / Н. А. Артемова, Л. И. Меньшикова, Л. А. Ошуркова // Экология человека. – 2003. – № 6. – С. 34–37.

8. Голикова, О. И. Гигиенические принципы прогнозирования состояния здоровья детского населения Крайнего Севера / О. И. Голикова // Гигиеническая наука и практика на рубеже XXI века: Материалы IX Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей. – Москва, 2001. – Т. 2. – С. 306–309.

9. Чернев, А. В. Некоторые вопросы охраны здоровья детей Кольского Севера / А. В. Чернев, С. В. Дмитриевская, И. В. Анохина // Гигиеническая наука и практика на рубеже XXI века. Материалы IX Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей. – Москва, 2001. – Т. 2. – С. 523–526.

10. Теддер, Ю. Р. Состояние здоровья и адаптация первоклассников к обучению в школе в условиях Севера / Ю. Р. Теддер, Т. С. Копосова // Экология человека. – 2000. – № 2. – С. 44–46.

11. Токарев, С. А. Основные тенденции в отношении факторов риска и здоровья подростков на Крайнем Севере / С. А. Токарев, Е. Л. Уманская, А. А. Буганов // Медицина труда и промышленная экология. – 2003. – № 9. – С. 29–32.

12. Ковызина, О. Л., Функциональные показатели школьников Северного города / О. Л. Ковызина, О. Н. Лепунова, С. В. Панин, В. С. Соловьев // Экология человека. – 2000. – № 2. – С. 41–43.

13. Усынина, А. А. Факторы риска перинатальной патологии. Состояние здоровья новорожденных детей в условиях Европейского Севера / А. А. Усынина, М. В. Усынин // Экология человека. – 2001. – № 1. – С. 43–46.

14. Шарапова, О. В. Всероссийская диспансеризация: основные тенденции в состоянии здоровья детей / О. В. Шарапова, Царегородцев А. Д. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2004 – № 1. – С. 56–60.

15. Юрьев, В. К. Социально – психологическая оценка репродуктивного здоровья школьниц Крайнего Севера / В. К. Юрьев, А. А. Наумова, В. Е. Самохвалов // Экология человека. – 2001. – № 1. – С. 53–55.

16. Кудря, Л. М. Протективная роль питания детей дошкольного возраста в условиях Европейского Севера: Автореферат. ... канд. мед .наук / Л. М. Кудря. – Архангельск, 1996. – 28 с.

17. Пряхин, Е. И. Роль ученых НИИ медицинских проблем Севера СОРАМН в решении вопросов охраны здоровья детей / Е. И. Пряхин // Там же. – 2001 . – № 2 . – С. 51–52.

18. Малявская, С. И. Распространенность метаболических факторов риска в популяции школьников г. Архангельска / С. И. Малявская, Т. А. Торопыгина, В. Е. Триль и др. // Экология человека. – 2001. – № 4. – С. 51–53.

19. Ковалев, И. В. Загрязненность окружающей среды и здоровье населения на Российском Севере / И. В. Ковалев. – Москва, - 1999 . – С. 86 – 126.

20. Чернев, А. В. Некоторые вопросы охраны здоровья детей Кольского Севера / А. В. Чернев, С. В. Дмитриевская, И. В. Анохина // Гигиеническая наука и практика на рубеже XXI века. Материалы IX Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей. – 2001. – Т. 2. – С. 523–526.

21. Прахин, Е. И. Медико-биологические аспекты здоровья детей на Севере / Е. И. Прахин // Сибирское медицинское обозрение. – 2002. – №1. – С. 3–7.

22. Голикова, О. И. Гигиенические принципы прогнозирования состояния здоровья детского населения Крайнего Севера / О. И. Голикова // Гигиеническая наука и практика на рубеже XXI века: Материалы IX Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей. – 2001. – Т. 2. – С. 306–309.

23. Капустина, Т. А. Этнические особенности распространенности хронических заболеваний уха, горла и носа у детей северных регионов Восточной Сибири / Т. А. Капустина // Педиатрия. – 2001. – № 2. – С. 49–51.

24. Ковызина, О. Л., Функциональные показатели школьников Северного города / О. Л. Ковызина, О. Н. Лепунова, С. В. Панин, В. С. Соловьев // Экология человека. – 2000. – № 2. – С. 41–43.

25. Официальный сайт Совета при Президенте России по реализации приоритетных национальных проектов и демографической политике. [Электронный ресурс] : Президиум совета при Президенте Российской Федерации по реализации приоритетных национальных проектов и демографической политике. – режим доступа : <http://government.ru/departments/288/events/>

26. Макарова, В. И. Основные проблемы здоровья детей на Севере России / В. И. Макарова, Л. И. Меньшикова // Экология человека. – 2003. – № 1. – С. 39–41

27. Проект ФЗ «Об Арктической зоне РФ» [Электронный ресурс] : Министерство регионального развития Российской Федерации – Режим доступа: [http://www.minregion.ru/documents/draft\\_documents/2714.html](http://www.minregion.ru/documents/draft_documents/2714.html)

28. Евминенко, С. А. Основные показатели здоровья матери и ребенка, деятельности службы охраны детства и родовспоможения в Красноярском крае / С. А. Евминенко, В. К. Соколовская, С. В. Семенова, Л. А. Куприянова // Статистический сборник. – 2015. – С. 85.

29. Официальный портал Красноярского края [Электронный ресурс] : режим доступа : <http://www.krskstate.ru/>

30. Этноатлас Красноярского края / гл. ред. Р. Г. Рафиков. — Изд. 2-е, переработано и дополнено. — Красноярск: Изд-во «Платина», 2008. — 224 с.

31. Медиапроект Гильдии межэтнической журналистики/ [Электронный ресурс] : «Национальный акцент» - Режим доступа: <http://nazaccent.ru/nations/>

32. Смольникова, М. В. Генетические дефекты иммунного реагирования при осложненной и рецидивирующей пневмококковой инфекции у детей / М. В. Смольникова, С. Ю. Терещенко // Современные проблемы науки и образования. – Пенза, 2017. - № 5. – С. 30

33. Helene Ingels. Immunodeficiency Among Children with Recurrent Invasive Pneumococcal Disease / Helene Ingels, Lone Schejbel, A.C. Lundstedt, Lise

Jensen, Inga A. Laursen, Lars P. Ryder, Niels H.H. Heegaard, Helle Konradsen, Jens Jorgen Christensen, Carsten Heilmann, Hanne V. Marquart. // *Pediatr Infect Dis J.* – 2015. - № 34(6). - P. 644–651.

34. Романов, А.О. Иммунологические факторы патогенеза HCV – инфекции / А.О. Романов, Т.В. Беляева, Е.В. Эсауленко // *Инфекционные болезни.* – 2010. - Т.11. – С.554 - 574.

35. Garred, P. Dual role of mannan - binding protein in infections: another case of heterosis? / P. Garred, M. Harboe, T. Oettinger, et al. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 1994. - № 21. – P. 125- 131.

36. Lipscombe, R. J. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. / R. J. Lipscombe, M. Sumiya, J. A. Summerfield, M. W. Turner // *Immunology.* – 1995. - № 85. – P. 660-667.

37. Eisen, D. P. Mannose-binding lectin deficiency and respiratory tract infection / D. P. Eisen // *Australia* – 2010. – P. 3

38. Roy, S. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study / S. Roy, K. Knox, S. Segal, D. Griffiths, C. E. Moore, K. I. Welsh, A. Smarason, N. P. Day, W. L. McPheat, D. W. Crook, A. V. Hill // *Lancet.* - 2002. - № 359. – P. 1569 - 1573.

39. Kronborg, G. Variant mannose-binding lectin alleles are not associated with susceptibility to or outcome of invasive pneumococcal infection in randomly included patients / G. Kronborg, N. Weis, H. O. Madsen, S. S. Pedersen, C. Wejse, H. Nielsen, P. Skinhoj, P. Garred // *J Infect Dis.* – 2002. - № 185 (10). – P. 1517 - 1520.

40. Lundbo, L. F. Mannose-binding lectin gene, MBL2, polymorphisms are not associated with susceptibility to invasive pneumococcal disease in children / L. F. Lundbo, Z. B. Harboe, L. N. Clausen, M. V. Hollegaard, H. T. Sorensen, D. M.

Hougaard, H. B. Konradsen, M. Norgaard, T. Benfield // Clin Infect Dis. - 2014. - № 59(4). – P. 66 - 71.

41. Eisen, D. P. Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection / D. P. Eisen, M. M. Dean, M. A. Boermeester, K. J. Fidler, A. C. Gordon, G. Kronborg, J. F. Kun, Y. L. Lau, A. Payeras, H. Valdimarsson, S. J. Brett, W. K. Ip, J. Mila, M. J. Peters, S. Saevarsdottir, van J. W. Till, C. J. Hinds, E. S. McBryde // Clin Infect Dis. – 2008. - № 47(4). – P.506 -510.

42. Ali, Y. M. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection / Y. M. Ali, N. J. Lynch, K. S. Haleem, T. Fujita, Y. Endo, S. Hansen, U. Holmskov, K. Takahashi, G. L. Stahl, T. Dudler, U. V. Girija, R. Wallis, A. Kadioglu, C. M. Stover, P. W. Andrew, W. J. Schwaeble // PLoS Pathog. - 2012. - №8(7).

43. Лосин, И. Е. Сердечно-сосудистые заболевания и маннозосвязывающий лектин / Р. М Шахнович, К. А. Зыков, М. Я. Руда // Кардиология. – 2014. – № 3. – С.64 - 70.

44. Esposito, S. Genetic polymorphisms and risk of recurrent wheezing in pediatric age / S. Esposito // Milan, Italy. – 2014. – P. 2.

45. Nuolivirta, K. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in infants with bronchiolitis and post-bronchiolitis wheezing / K. Nuolivirta // Finland – 2012. – P. 6.

46. Koponen, P. Association of MBL2 polymorphism with asthma after bronchiolitis in infancy / P. Koponen // Finland. – 2012. – P. 6.

47. Eisen, D. P. Mannose-binding lectin deficiency and respiratory tract infection / D. P. Eisen // Australia – 2010. – P. 3.

48. Лосин, И. Е. Маннозо-связывающий лектин и факторы активности нейтрофильного фагоцитоза у больных с ОКС. Влияние на течение и прогноз по данным двухлетнего проспективного наблюдения: автореферат диссертация



кандидат медицинских наук: 14.01.05; 14.01.05 / Лосин Илья Евгеньевич. – Москва, 2014. – С.24 – 32.

49. Kwakkel-van Erp, J. Mannose-binding lectin deficiency linked to cytomegalovirus (CMV) reactivation and survival in lung transplantation / J. Kwakkel-van Erp, A. Paantjens, van D. Kessel et al. // Clinical and Experimental Immunology. – 2011, - № 3. – P. 410–416.

50. Kilpatrick, D. C. Human L-Ficolin (Ficolin-2) and Its Clinical Significance / D. C. Kilpatrick, J. D. Chalmers // Journal of Biomedicine and Biotechnology. - 2012.

51. Hummelshoj, T. Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2 / T. Hummelshoj, L. Munthe-Fog, H.O. Madsen, T. Fujita, M. Matsushita, P. Garred // Hum Mol Genet. - 2005. - № 14. - P. 1651-1658.

52. Cedzynski, M. Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene / M. Cedzynski, L. Nuytinck, A. P. Atkinson, St Swierzko A., K. Zeman, J. Szemraj, A. Szala, M. L. Turner, D. C. Kilpatrick // Clin. Exp. Immunol. - 2007. - № 150. - P. 99-104.

53. Mishra, A. Association of Ficolin-2 Serum Levels and FCN2 Genetic Variants with Indian Visceral Leishmania / A. Mishra, J. S. Antony, P. Sundaravadivel, H. V. Tong, C. G. Meyer, R. D. Jalli, T. P. Velavan, K. Thangaraj // PLoSOne.- 2015.

54. Mishra, A. Association of Ficolin-2 Serum Levels and FCN2 Genetic Variants with Indian Visceral Leishmaniasis / A. Mishra, J. S. Antony, P. Sundaravadivel et al. // PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – № 5. – P.129 – 138.

55. Munthe-Fog, L. The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the Ficolin-2 serum levels / L. Munthe-Fog, T. Hummelshoj, B. E. Hansen et al. // Scand J Immunol. – 2007. – Vol. 65. – № 4. – P. 383-392.

56. Herpers, B. L. Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L - ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors / B. L. Herpers, M. M. Immink, B. A. De Jong et al. // Mol Immunol. – 2006. – Vol. 43. – № 7. – P. 851-855.

57. Ruskamp, J. M. Polymorphisms in the mannan-binding lectin gene are not associated with questionnaire-reported respiratory tract infections in children / J. M. Ruskamp, M. O. Hoekstra, D. S. Postma et al. // J Infect Dis. – 2008. – Vol. 198. – № 11. – P. 1707-1713.

58. Cedzynski, M. Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene / M. Cedzynski, L. Nuytinck, A. P. Atkinson et al. // Clin Exp Immunol. – 2007. – Vol. 150. – № 1. – P. 99-104.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В. Крамасюк / Крамасюк В. А. /  
подпись      инициалы, фамилия

« 9 » 06 20 18 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

060301.07

Распределение генотипов гена фиколина (FCN2) в популяциях  
Красноярского края

Научный руководитель

В. Крамасюк

д.б.н. Крамасюк В. А.

Научный консультант

М. В. Смольникова

к.б.н. Смольникова М. В.

Студент ББ14-01Б,041402525

Я. М. Дынина

Дынина Я. М.

Красноярск 2018